



*Pasantía en Genética*

*Forense*

*El ADN, “tu propio*

*Juez”*

Natalia Yael Sandberg Lacasa

Proyecto – Pasantía

Laboratorio biológico de Policía Técnica

Jefa –Tutora: Dra. Sinthia Pagano

Licenciatura en biología – Profundización en Genética

<b>SUMARIO</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
Genética Forense	6
Secuencias Variables. Reseña histórica	8
Regiones hipervariables	8
¿Por qué el uso de los STRs suplantó al de los VNTRs en estudios de criminalística?	10
El Cromosoma Y: Valor de su análisis en la identificación humana	11
ADN mitocondrial	13
<b>OBJETIVO</b>	<b>15</b>
Objetivos específicos:	15
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>16</b>
1. Diagnóstico presuntivo, Test de la Bencidina (Reacción de Adler)	16
2. Ensayo de Luminol	17
3. Test de Teichmann	18
4. Prueba inmunológica para sangre humana (KIT DIA SPOT)	18
1. Ensayo de Fofatesmo KM	19
2. Ensayos de certeza (estudios microscópicos)	20
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE CASOS FORENSES</b>	<b>33</b>
INFORME: Caso Nº 1: Clínica de Abortos	34
INFORME: Caso Nº 2: Sangre Humana, estudio de cromosomas autosómicos	38
INFORME: Caso Nº 3: Paternidad: estudio de cromosomas autosómicos en hueso y saliva	42
INFORME: Caso Nº 4: Violación, estudio de cromosoma Y y autosómicos.	45
INFORME: Caso Nº 5: Cabellos y estudio con ADN Mitocondrial	50
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>53</b>

---

<b>ANEXO I</b>	<b>55</b>
<b>Búsqueda de sangre</b>	<b>55</b>
1- Diagnóstico presuntivo, Test de la Bencidina (Reacción de Adler)	55
2- Ensayo de Luminol	55
3- Test de Teichmann	56
<b>Búsqueda de semen</b>	<b>57</b>
1)- Ensayos de certeza (estudios microscópicos)	57
<b>Extracciones</b>	<b>58</b>
1.1) Extracción de ADN (manchas de sangre)	58
1.2) Extracción Diferencial del ADN en hisopos vaginales	59
1.3) Extracción de ADN nuclear en pelos	60
1.4) Extracción de ADN de hueso	61
1.5) Extracción de tarjetas FTA (sangre y saliva)	62
<b>Cuantificación</b>	<b>62</b>
3.1) Preparación en geles de agarosa	62
3.2) Preparación de muestras. Electroforesis.	63
<b>Amplificación</b>	<b>63</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>65</b>

## Sumario

*El crimen surgió con el hombre mismo, y éste, conciente, de la punitividad de su acción, ha intentado ocultar su responsabilidad en los hechos que día a día acontecen, la extrema urgencia de esclarecerlos llevo al surgimiento de la "Ciencia Forense".*

*Este trabajo presentará un resumen de los mecanismos y los métodos que dicha ciencia utiliza para la resolución de distintos casos forenses, destruyendo así de la mente humana, la errónea idea del "crimen perfecto".*

*La base de esta ciencia es el análisis de una serie de fragmentos de ADN presentes en todos los individuos pero que poseen la característica de ser altamente variables o polimórficos entre los mismos.*

*El análisis de un determinado número de estas secuencias o fragmentos de ADN nos permitirá identificar a un individuo con una probabilidad muy cercana al 100%.*

## Introducción

*"El ADN es un Universo sin explorar y recién estamos empezando a conocer sus secretos". (Corach y cols, 1995)*

Solo una pequeña parte de la molécula de ADN nos hace diferentes unos a otros. En la estructura y organización de dicha molécula, no hay diferencias intelectuales ni religiosas, en el ADN, lo que hace la diferencia son ciertas secuencias que nos hacen únicos y por tanto, identificables con cierta fiabilidad a través de ellos.

Para analizar dicho polimorfismo del ADN, los laboratorios de Genética Forense utilizan una serie de técnicas que están en continua evolución, consiguiendo que cada vez la identificación por medio del ADN sea más rápida y precisa *(Corach y cols, 1995.)*

En el ámbito científico no cabe duda que el análisis de los polimorfismos de ADN no sea una prueba más, ya que por sus características ha supuesto una importante modificación cualitativa y cuantitativa a la investigación forense.

La sociedad por tanto debe determinar la identidad de la persona sospechosa de realizar el acto criminal. Este problema se ha ido solventando gracias a la aplicación de los conocimientos científicos presentes en cada momento histórico, posibilitando y exigiendo el nacimiento de ciencias especializadas *(Butler, 2001)*.

La expansión y difusión de novedades que implican la aplicación de metodologías basadas en el ADN para esclarecer y resolver casos prácticos que se presentan en criminalística y en investigación biológica de la paternidad, ha hecho que la frase "el ADN es la clave de la investigación" pase a ser de uso común y ser una de las más importantes evidencias sobre la que se asientan defensas o acusaciones.

Con la denominación de Genética Forense se define el uso de ciertas técnicas empleadas en genética para la identificación de los individuos en base al análisis de los polimorfismos del ADN geonómico o cromosómico (en cromosomas autosómicos y del cromosoma Y) y mitocondrial.

Esta disciplina estudia fundamentalmente tres áreas:

- **investigación biológica de la paternidad,**
- **investigación de indicios en criminalística biológica,**
- **resolución de problemas de identificación.**

Las formas de identificar a las personas con un carácter único e inequívoco avanzan más rápidamente debido a la complejidad de nuestra sociedad (*Angel y cols, 2003*).

La variación individual en el ámbito de especie es la condición indispensable para que esta pueda evolucionar y diferenciarse.

La población se define a menudo con mayor precisión como *Deme*, término adoptado en 1931 (*Lorente, 1995*). La genética considera que en el ámbito del deme existe un patrimonio muy preciso de genes (pool génico). Una población, aun presentando una serie de características morfológicas y funcionales (fenotipos) homogéneas en conjunto, muestra una apreciable variabilidad individual, en parte sostenida genéticamente y en parte derivada de la acción del ambiente. Esto equivale a decir que, en la práctica, en una población con sexos separados no es posible encontrar dos individuos que sean exactamente iguales.

La *variación*, es muy amplia en las poblaciones humanas, ni siquiera dos gemelos son en realidad totalmente idénticos entre sí. Resultan variables la estatura, el número de glóbulos rojos de la sangre, el latido cardiaco, las impresiones digitales, entre otras características.

*Las causas de la variación en las poblaciones naturales han de buscarse esencialmente en la diversa constitución genética (genotipo) de cada individuo y en la influencia que las diversas condiciones ambientales ejercen en la manifestación de los caracteres hereditarios (Lorente, 1995).*

La variación fenotípica no es heredable. Está limitada a la generación en la cual se ha producido, y no reviste importancia en lo referente a la evolución. En cambio, existe otro tipo de variación

individual, ligada al diferente repertorio de material genético, o bien derivada de las transformaciones azarosas que puede sufrir ese material en el transcurso del tiempo; se trata de la **variación genotípica**, transmisible a las futuras generaciones según leyes precisas. Representa la condición indispensable para la que pueda iniciarse un proceso evolutivo (*Kumar y cols, 1993*).

Todo organismo, aun el más simple, contiene una enorme cantidad de información. Esta información se repite en cada una de las células, organizada en unidades llamadas genes, los cuales están formados por ADN. Los genes controlan todos los aspectos de la vida de cada organismo, incluyendo metabolismo, forma, desarrollo y reproducción. De ellos depende la continuidad de la vida, porque constituyen el enlace esencial de las generaciones. Esta transmisión de información genética de los padres a los hijos se denomina herencia, y la rama de la biología que estudia la estructura, transmisión y expresión de la información hereditaria es la **genética** (*Lorente, 1995*).

Desde principio de siglo, la ciencia de la genética ha experimentado notables avances. En la actualidad, el campo de la genética molecular ejerce una influencia decisiva en diversas áreas de la biología.

## Genética Forense

El ADN es el material genético que conforma el código para determinar las características de los individuos. Excepto los gemelos univitelinos, cada individuo posee un código de ADN que es único.

Debemos saber que la nueva disciplina o subespecialidad dentro de la Medicina Forense: la Genética Forense no apareció de un día para el otro, sino que se dio lugar luego de una gran evolución de técnicas "ancestrales".

A principios del siglo XX cuando Kart Landsteiner describe el sistema ABO de los hematíes y Van Dungen y Hirschfeld descubren su transmisión hereditaria; surge la hemogenética Forense como una rama de la criminalística con el fin de la identificación genética (*Falco, 1936*).

Los alelos del grupo sanguíneo ABO controlan la expresión de algunos antígenos eritrocitarios utilizados como marcadores genéticos que permitían incluir o excluir a una persona como sospechosa por poseer una combinación genética igual o diferente a la del vestigio biológico hallado en el lugar de

los hechos. La determinación de los tipos sanguíneos de las personas implicadas era una de las formas "primitivas" tradicionales de resolver disputas legales de parentesco y casos de criminalística.

Sin embargo *las pruebas de tipo sanguíneo nunca pueden asegurar que tal persona esté involucrada, sólo puede determinar si podría estarlo.*

También con el fin de la discriminación genética de la persona se investigaron otros marcadores como ser sistema HLA, proteínas séricas y enzimas eritrocitarias; pero dichos marcadores podían incluir o excluir a una persona como posible sospechoso por poseer una combinación genética igual o diferente a la del vestigio biológico hallado en el lugar de los hechos, procedimientos no tan específicos ni discriminativos comparados con los desempeñados al momento (*Lorente, 1995*).

Pero fue más adelante (mediados del siglo XX, 1953) cuando se produciría una verdadera revolución en el mundo científico con el descubrimiento del ADN, su estructura y el posterior avance en las técnicas de análisis de dicha molécula. La *Hemogenética* evolucionó considerablemente hasta el punto que hoy en día puede hablarse de una nueva subespecialidad dentro de la Medicina Forense: la *Genética Forense*. Dicha ciencia se basa principalmente en el estudio de unas regiones del ADN que presentan variabilidad entre los distintos organismos, es decir, estudia regiones polimórficas del ADN. Dichas regiones consisten en una serie de fragmentos de ADN presentes en todos los individuos, pero que poseen la característica de ser altamente variables o polimórficos entre los mismos (*Dpto. Toxicología, 2002*). Las diferencias entre personas tienen su origen en la existencia de variabilidad en la zona de corte de enzimas debido a variaciones ocurridas a lo largo del tiempo por mutaciones en el ADN. El análisis de un determinado número de estas secuencias permite identificar a un individuo con una probabilidad muy cercana al 100%. Además de ser muy polimórfico, el ADN que se utiliza para la identificación en Genética Forense (*Technical Manual Power Plex 16, 2003*) es no codificante o no expresivo, por lo que no revela características fenotípicas de los individuos. El ADN codificante en general es muy poco variable con excepción de la región HLA, por tanto en ciencias forenses carece de interés al no tener un fin identificativo. Dichos avances serán tratados más adelante en la introducción, ahora veremos cómo se produjo esta "evolución científica" en el plano de la identificación forense.

## Secuencias Variables. Reseña histórica

La existencia de las regiones polimórficas en el ADN humano, permitiría disponer de una herramienta capaz de identificar individuos y establecer vínculos de parentesco. En 1980 Wyman y White, al analizar el gen de la insulina humana, demostraron la existencia de secuencias polimórficas en nuestro genoma (*Martínez, 1999*).

Sin embargo, la posibilidad de aplicación de estas secuencias variables en el campo de la identificación de individuos fue concebida por Alec Jeffreys y sus colaboradores en 1985. Sus estudios de la evolución molecular de la familia génica de las globinas lo condujeron al análisis del gen de la mioglobina, en el que descubrieron la existencia de secuencias hipervariables que al ser usadas como sondas moleculares (fragmentos de ADN marcados que reconocen secuencias homólogas previamente fijadas a soportes sólidos) eran capaces de generar patrones de bandas de hibridación individuo – específico (*Martínez, 1999*).

Estos patrones hacen posible la identificación de un individuo y el establecimiento de vínculos biológicos de parentesco con otros potencialmente relacionados, dada la herencia mendeliana de las bandas detectables. Desde entonces, en un periodo relativamente corto de tiempo, se produjo una verdadera revolución tecnológica. Se desarrollaron nuevos y más eficientes sistemas de identificación molecular. La razón que determinó esta revolución tecnológica reside en la aplicación del potencial identificador del ADN en el ámbito judicial (*Kirby, 1992*).

La identificación de restos humanos en casos de desastres en masa, de sospechosos en casos de violaciones, de vínculos de parentesco en casos de paternidad disputada, entre otros, han constituido los focos de atención en los que la identificación molecular podría aportar a la práctica pericial una nueva herramienta objetiva que contribuye a una mejor administración de justicia.

## Regiones hipervariables

La variabilidad puede resultar, por un lado, de la diferente longitud de fragmentos de ADN o por otro, de cambios en su secuencia nucleotídica. La especificidad de individuos observada en los patrones de banda de hibridación molecular, refleja la existencia en nuestro genoma, de un tipo particular de regiones.

Las variantes de longitud denominadas genéricamente **Repeticiones en Tándem de Número Variable o VNTR**, se caracterizan por presentar una organización semejante; segmentos de ADN similares se encuentran dispuestos en tándem (uno detrás de otro) en número variable de veces y flanqueados por secuencias no redundantes en las cuales se hallan, o bien, sitios de reconocimiento para el corte por parte de tijeras moleculares específicas denominadas **endonucleasas de restricción**, o bien, secuencias adecuadas para la unión de pequeñas secuencias iniciadoras (primers), que posibiliten el copiado de la cadena, mediante el proceso de polimerización del fragmento complementario a la secuencia de interés por medio de la **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)** (Mullis y cols, 1987).

El ADN repetido (geonómico) se clasifica a su vez en dos grandes grupos de acuerdo a su organización estructural y la frecuencia de reiteración (Butler, 2001):

1. **Secuencias repetidas en tandem o VNTR** (variable number of tandem repeats) de las cuales encontramos dos tipos:
  - **MVRs** (minisatellite variant repeats): repeticiones en tandem de secuencia menor a 60 pb. La metodología que se aplica para su estudio en general se basan en la técnica de transferencia e hibridación de southern.
  - **STRs** (microsatellite short tandem repeats) repeticiones de secuencias en tandem menores a 6 pb. Pueden ser estudiados mediante PCR.
2. **Secuencias repetidas dispersas** en los que encontramos dos grandes grupos:
  - **SINEs** elementos intercalados cortos (menores a 500 pb)
  - **LINEs** secuencias intercaladas largas (mayores a 500 pb)

A diferencia de las repeticiones en tándem (unas a continuación de las otras a lo largo del fragmento), entre los elementos intercalados existen fragmentos de ADN no repetitivo (asociados a elementos transponibles).

Además de existir una clara diferencia metodológica entre los minisatélites evaluados por hibridación con sondas específicas y los revelados por amplificación y visualización sobre geles de poliacrilamida o mediante sistemas automatizados basados en electroforesis capilar, existen otras diferencias intrínsecas a cada sistema. Entre ellas, los primeros exhiben un mayor número de variantes alélicas en la población que los segundos, lo que determina un mayor poder resolutivo de los

RFLPs que los STRs. Los microsatélites en cambio solo pueden ser resueltos mediante PCR y geles de alta resolución de PAGE, en formato manual, o bien mediante geles de alta resolución o electroforesis capilar, en formato automatizado. Los *microsatélites o STRs (Short Tandem Repeats)* permiten el análisis de muestras de ADN escaso y/o muy degradado. Si bien cada STR exhibe un reducido número de alelos y algunos de ellos suele ser preponderante, el gran número de STRs actualmente disponibles en reacciones múltiples, compensan estas limitaciones. Son en la actualidad los marcadores genéticos de elección tanto en las investigaciones forenses como así en los estudios de vínculos biológicos de parentesco. Los STRs utilizados se encuentran presentes en cromosomas autosómicos y en los cromosomas sexuales X e Y (Kirby, 1992).

El estudio de RFLP, aunque es extremadamente efectivo para el análisis de los VNTR, es lento de efectuar, y requiere en la mayoría de los casos el uso de materiales radiactivos (hoy suplantados por otros mecanismos como ser el de quimioluminiscencia); y cantidades de 10 - 50 nanogramos de ADN genómico. Es por ello que la ciencia avanzó permitiendo una alternativa en el estudio forense para el estudio del ADN; se comenzó a usar la *PCR o reacción en cadena de la polimerasa*. Bastan unos indicios mínimos ya que se utiliza PCR para amplificar la muestra; la calidad de la muestra no se ve especialmente comprometida ya que pueden emplearse STRs cuando se trata de tejidos en putrefacción o muestras milenarias y finalmente el ADN está presente en la mayoría de los indicios que pueden recogerse de la escena del crimen como pelos, semen, sangre, huesos (*Technical Manual Power Plex 16, 2003*). Gracias a la PCR se han podido resolver un gran número de casos en criminalística que hasta entonces eran desestimados por no poseer la suficiente cantidad de muestra para su análisis por RFLP.

### ¿Por qué el uso de los STRs suplantó al de los VNTRs en estudios de criminalística?

El 50-80% de los vestigios biológicos que llegan al laboratorio de genética forense presentan cantidades muy pequeñas de ADN o en avanzado estado de degradación lo que impide su análisis por marcadores VNTR. Es aquí donde adquiere importancia el uso de los microsatélites o STR (Short tandem repeat) en el genoma humano que permiten con indicios mínimos de ADN lograr amplificar por la técnica de PCR muestra a pesar de tratarse de tejidos en putrefacción o muestras milenarias.

Los STRs son regiones altamente polimórficas que se encuentran a lo largo de todo el genoma, compuestos por una secuencia de 2-7pb que se repite la unidad de secuencia. Existe como media un microsatélite cada 5.000-10.000pb. Debido a que el tamaño de los alelos de los loci STR es generalmente menor a 350 pb, son susceptibles de ser analizados mediante técnicas de amplificación genética (PCR como se dijo anteriormente) que ofrecen una gran sensibilidad (*Watson, 2006*).

Es posible, y de hecho en este laboratorio se realiza un análisis simultáneo de diferentes STRs (más precisamente quince) más el locus de la Amelogenina para la determinación del sexo, mediante el procedimiento conocido como ***Multiplex-PCR***.

El método más popular para la determinación del sexo, es el sistema de la ***Amelogenina***, que como mencionamos puede ser estudiado en conjunto con el análisis de los STRs autosómicos. La Amelogenina es un gen que codifica para proteínas encontradas en el esmalte de los dientes, que mantiene secuencias homólogas tanto en el cromosoma X como en el cromosoma Y. El "*British Forensic Science Service*" fue el primero en describir los set de primers tan particulares que amplifican esta región, que siguen siendo los utilizados actualmente en los laboratorios de ADN. Estos primers flanquean una delección de 6pb en el primer intrón del gen de la amelogenina en el cromosoma X. La amplificación por PCR de esta región utilizando dichos primers, resulta en amplicones de 106 y 112pb para el cromosoma X y para el cromosoma Y respectivamente (usados por el Sistema Power Plex). También en el mercado encontramos otros primers que amplifican 212 pb para el cromosoma X y 218pb para el cromosoma Y (usados en sistemas VNTR), siempre manteniendo 6pb de delección entre los productos amplificados (*Butler, 2001*).

En este laboratorio se trabaja con STRs de cromosomas autosómicos y con STRs del cromosoma Y dependiendo de los requerimientos del caso a analizar.

## El Cromosoma Y: Valor de su análisis en la identificación humana

El ***cromosoma Y*** tiene una morfología acrocéntrica y tiene una región heterocromática en su brazo largo que contiene secuencias polimórficas altamente repetidas. Cabe destacar que frente a la falta de homología con otro cromosoma, este en meiosis sufre una mínima recombinación, lo que lleva a que sea ***heredado en bloque*** (grupo de ligamiento). De esta manera esta región será cedida de padre a hijos donde las mutaciones de "novo" serán el único proceso posible de variación en estas regiones.

Es por ello que también se pueden analizar microsatélites (STRs) (*Thechnical Manual Power Plex Y, 2003*).

En casuística forense, los polimorfismos de cromosoma Y, se utilizan en la resolución de casos complejos de investigación biológica de la paternidad, pero, sobre todo, tienen gran interés en el análisis del componente masculino en mezclas complejas hombre-mujer, lo que tiene una significación especial en el estudio de muestras biológicas relacionadas con delitos sexuales. Con la tipificación de marcadores del cromosoma Y se pueden interpretar resultados que, debido al estado o tipo de evidencia, no pueden ser resueltos mediante marcadores autosómicos; por ejemplo, cuando el material femenino se encuentra en mucho mayor proporción que el masculino y no permite su resolución mediante marcadores autosómicos (relación 10 a 1 respectivamente). También es útil en situaciones en donde se observan varones azospermicos o vasectomizados, también en mezclas sangre/sangre o saliva/sangre, donde la ausencia de células espermáticas no permite la extracción diferencial de ADN masculino. Además, cuando el número de individuos involucrados en un hecho es grande, puede ser que el resultado de marcadores autosómicos sea muy difícil de interpretar y por lo tanto la tipificación de marcadores del cromosoma Y contribuya con una eficiente investigación de las evidencias (*Akane y cols, 1992*).

Utilizando primers específicos se puede detectar la presencia de ADN masculino en evidencias donde el ADN femenino se encuentra en grandes proporciones. Si bien la tipificación del cromosoma Y tiene grandes ventajas, también muchas limitaciones (*Michael, 2001*).

La mayor parte del cromosoma Y es heredado de padre a hijos sin sufrir recombinación, como fue mencionado anteriormente y por tanto las mutaciones son el único mecanismo de variación en el tiempo entre hombres relacionados por línea paterna. Por esto, una exclusión en la tipificación de estos marcadores en un caso forense puede ayudar, pero una coincidencia o "Match" entre una evidencia y un sospechoso solo significa que ese individuo pudo dejar esa mancha o pudo ser un hermano, el padre, el hijo, el tío, primo paterno, etc (siempre que sobre estos exista alguna vinculación al caso). Por lo tanto nunca se puede hablar de la existencia de inclusión tipificando estos marcadores, como si lo permite una coincidencia con marcadores autosómicos (*Michael, 2001*).

Por otro lado, la existencia de muchos parientes con el mismo cromosoma Y, aumenta el número de muestras de referencia para la investigación de desaparición de personas y desastres en masa. En casos de paternidad deficiente, cuando el padre ha fallecido o no está disponible, el cromosoma Y

puede ser de gran utilidad. Sin embargo, los marcadores autosómicos son los de preferencia, si es posible, debido a su alto poder de discriminación (*Manual de curso de postgrado en estadística aplicada a Genética Forense, 2002*).

El número de STRs del cromosoma Y disponibles para ser usados en identificación humana se ha incrementado dramáticamente en el último tiempo.

En 1996 un grupo de marcadores fue elegido para conformar el haplotipo mínimo (nos referimos al término **haplotipo** cuando cada individuo tiene un solo alelo para cada locus). Este incluye STRs de copia única (DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393) y al DYS385 a/b que es un STR multicopia altamente polimórfico (*Manual fabricate Kit Pcr Amplification, 1993*).

En enero del 2003 el Grupo Científico de Trabajo en Métodos de Análisis de ADN (SWGDM) recomendó el uso del haplotipo mínimo más dos STRs adicionales, el DYS438 y el DYS439.

El conjunto de Y-STRs constituye un haplotipo y la frecuencia de un haplotipo debe ser determinada en una población representativa. No es válido multiplicar las frecuencias alélicas individuales. Cuando en un caso se obtienen perfiles coincidentes se debe conocer la frecuencia de ese haplotipo en la población para poder calcular la probabilidad de coincidencia.

La base de datos más importante del Cromosoma Y, es la creada por Lutz Rower en Berlín (Alemania), que se encuentra disponible en Internet desde el año 2000 y fue completamente actualizada en el 2009. La información en esta base de datos proviene de 89 instituciones de 39 países del mundo. En la actualidad cuenta con 86.568 haplotipos de 670 poblaciones del mundo (<http://www.yhrd.org>). (*Corach y cols, 1995*)

## ADN mitocondrial

Otras secuencias variables de gran aplicación en la identificación son las contenidas en la región de control del genoma mitocondrial (ADNmt). El **ADN mitocondrial** presente en el citoplasma, en las mitocondrias en el momento de producida la fecundación es aportado por el óvulo. Por esta razón el estudio del mismo se puede aplicar solo en casos de identificación de individuos de la matrilinea. El ADN mitocondrial además de poseer un genoma circular covalentemente cerrado lo que aumenta su estabilidad, posee más copias que el ADN nuclear, ya que pueden haber cientos de mitocondrias por

célula, éste se usa para muestras muy degradadas y/o en casos donde estén involucrados cabellos *sin bulbo* y por lo tanto no ser posible su identificación por ADN nuclear (Martínez Begoña, 1999). Se amplifican las regiones HV1 y HV2 ubicadas dentro de la región control, muy polimórfica, el resto de la molécula de este ADN circular es bastante conservada, por tanto no aporta información útil para el estudio forense. Los científicos forenses **amplifican** la región HV1 y HV2 del ADNmt por PCR y luego cada región es **secuenciada** posibilitando analizar variantes de secuencia al compararlas con una secuencia de referencia (Lorente, 1995) (Bandlet y cols, 2002).

La base de la técnica de secuenciación desarrollada por Sanger en 1997 es el fundamento de la secuenciación automática realizada por el equipo ABI PRISM 310 utilizado en este Laboratorio. Este procedimiento utiliza un oligonucleótido o primer que se une al fragmento de ADN purificado que va a ser secuenciado. El primer es elongado a través de un templado por una polimerasa que va incorporando nucleótidos (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) y uno de los cuatro dideoxynucleótidos (ddNTPs): ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP. Cuando un dideoxynucleótido es incorporado la elongación se interrumpe. De esta manera el fragmento sintetizado tendrá una longitud que dependerá del sitio en el que se ha incorporado el ddNTP. Debido a que los ddNTPs utilizados están marcados con fluorocromos, los fragmentos pueden ser detectados en la inyección capilar mediante el láser que los excita, el resultado es un electroferograma con picos que corresponden a cada una de las bases secuenciadas (a las cuales les asigna un color diferente) (Alonso y cols, 1999).

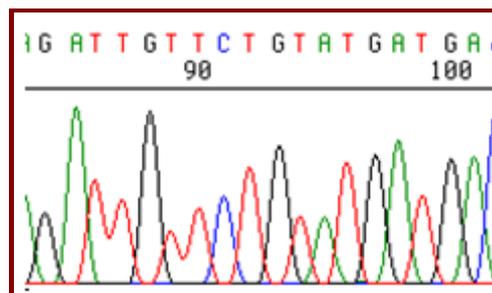


Fig.1)- Electroferograma observado en la secuenciación.

Se ha demostrado que la tasa de mutación del ADN mitocondrial es sustancialmente más alta que la del ADN nuclear. Por lo tanto, no es infrecuente encontrar diferencias en la secuencia de ADN al comparar parientes maternos cercanos (tales como madre e hijo). Por lo tanto, si hay falta de coincidencia, este hecho no lo excluye automáticamente, aunque la fuerza de evidencia es menor que cuando hay coincidencia o match. Las diferencias pueden ser de una base por ejemplo, por tanto la fuerza de la evidencia será dependiente de la tasa de mutación de esa posición. De esta manera es

posible aplicar en estos casos el índice de verosimilitud (LR), donde la probabilidad de observar coincidencia o match estará contemplada en el numerador. Si hay muchas diferencias entre los individuos a contemplar, esta probabilidad es efectivamente cero, y se puede informar una exclusión; de lo contrario la probabilidad de si son completamente iguales es 1 (*Anderson y cols, 1991*).

## Objetivo

El objetivo de la pasantía fue familiarizarse con las metodologías de Genética Forense que se utilizan en el Laboratorio Biológico de la Policía Científica del Uruguay.

### Objetivos específicos:

- Familiarización con la base teórica de la metodología aplicada
- Aprendizaje de métodos de ensayos preliminares y en caso de que corresponda, aplicación de técnicas genético moleculares para extracción ADN e interpretación de los resultados
- Familiarización con análisis estadísticos
- Participación en el completo análisis de cinco casos forenses, representativos de los que día a día llegan a dicho laboratorio para ser analizados

## Materiales y Métodos

Cuando llega un indicio al laboratorio, el mismo debe venir acompañado de un oficio o novedad donde se especifique el objeto de la pericia solicitada. Según ésta, el indicio seguirá una secuencia determinada. Para todos los casos, primero se procederá a la observación y descripción de dicho/s indicio/s.

Si se trata de una pericia para búsqueda de sangre, lo primero que se le practica es un ensayo de probabilidad denominado **Adler** y/o en el caso de superficies que se sospechan hayan sido lavadas se utiliza otro ensayo con el mismo fin llamado **Luminol**.

Si estos últimos son negativos ya culmina el análisis concluyendo que no hay sangre presente, de lo contrario se procederá a un ensayo de certeza de sangre: **Teichmann**.

En algunas oportunidades, y si el juez lo solicita o al laboratorio le parece de utilidad, se practica el ensayo de especie humana: **Dia Spot**. Si este último resulta negativo se puede afirmar que se trata de sangre de otra especie (animal). Pero si resulta positivo se afirmará que dicha sangre es de origen humano. Debajo se detallan las técnicas utilizadas y los procedimientos específicos se detallan en el anexo I.

### 1. Diagnóstico presuntivo, Test de la Bencidina (Reacción de Adler)

- Este test se basa en la propiedad del grupo **hem** de la hemoglobina de provocar la descomposición del peróxido de hidrógeno con liberación de oxígeno naciente el que, en presencia de bencidina, oxida este compuesto produciendo una coloración turquesa (fig.2).
- Tiene una sensibilidad = 1 parte en 300.000 a 500.000
- Un test negativo es evidencia concluyente para examen posterior. Un test positivo se considera como diagnóstico presuntivo, ya que existen otras sustancias con grupo hem ó con actividad similar a la peroxidasa sanguínea.



Fig.2)- Ensayo Adler

## 2. Ensayo de Luminol

- Al pulverizar la zona a analizar con luminol y en completa oscuridad con agua oxigenada (10 vol), la aparición de luminiscencia indica un resultado positivo.
- Esta reacción es la mejor para localizar manchas no visibles (en prendas oscuras, en superficies grandes del lugar del hecho que han sido lavadas, etc).
- Usando el luminol se puede detectar sangre en dilución con una sensibilidad de 1= 500.000, demorando 5 seg. en aparecer la luminiscencia, que persiste luego por aprox. 15 min. Recordar que es un ensayo de probabilidad de haber estado en contacto con sangre.
- Si se obtiene un resultado positivo en el test de la bencidina se procede a extraer la muestra del soporte en la que se encuentra adherida:
  - en materiales duros (vidrios, madera, cemento, metales, otros) por raspado con hoja de bisturí.
  - en materiales blandos (telas, papel) por maceración directa.
- Se coloca la muestra en agua destilada (maceración), para efectuarle el test de Teichmann.

### 3. Test de Teichmann

#### Obtención de cristales de hemina (test de teichmann):

- Este test se basa en el hecho que la hemoglobina es fácilmente hidrolizada por ácido, liberando su fracción proteica (globina), que generalmente es desnaturalizada en el proceso y su grupo prostético, (el hem). En estas condiciones, la oxidación del hierro del grupo hem tiene lugar rápidamente y en presencia de iones cloruro, se forman cristales característicos de cloruro de ferriprotoporfirina ó hemina (ó hematina).

### 4. Prueba inmunológica para sangre humana (KIT DIA SPOT)

- El mecanismo se basa en la reacción de las globulinas específicas presentes en la sangre humana con las antiglobulinas específicas de éstas presentes en el kit. Si las primeras están presentes en la muestra, la reacción será positiva y se observará la presencia de dos bandas; de lo contrario se observará una. Se trata de una inmunoreacción (*Simon J.B., 1985*).



Fig. 3)- kit Dia spot

En el caso de búsqueda de semen (agresiones sexuales, atentados al pudor, etc) el primer ensayo a realizar dependerá del tipo de indicio que se haya recibido. Cuando se reciben prendas de vestir, sábanas, ropa interior, lo primero que se realiza es una búsqueda de manchas con las características físicas de semen (en ocasiones y según la calidad del soporte, se presentan en escamas de color blanco grisáceo; en cuanto a su consistencia las manchas de esperma endurecen o encartonan los tejidos sobre los cuales se asientan). A saber, las manchas de semen están compuestas

principalmente por albuminoides, lecitina, cerebrina, sustancias inorgánicas como fosfatos, células epiteliales y otros diversos productos de las diversas vías que atraviesa. Debajo se detallan las técnicas utilizadas y los procedimientos específicos se detallan en el anexo I:

Con ayuda de una **luz UV** al pasarla por la superficie a analizar; se observa fluorescencia blanca verdosa que no es específica (en caso de ser positiva), aunque sirve para localizarlas.

Una vez ubicada la mancha y en el caso de recibir hisopados, el ensayo que se le practica es una probabilidad de semen: **fosfatesmo**. En caso de que sea negativo, se podría afirmar la ausencia de semen en la muestra. Si es positivo el ensayo se continúa con el ensayo de certeza: **Christman-tree**. A continuación se detallan las técnicas utilizadas y los procedimientos específicos se detallan en el anexo I.

## 1. Ensayo de Fosfatesmo KM

- Localizada la mancha, se recorta un trocito y se lo somete a su ablandamiento con agua destilada. Luego unos 15 seg. aproximadamente se le realiza el ensayo de **fosfatasa ácida** o estudio de la actividad enzimática de la fosfatasa ácida sérica. Los fosfatos ácidos se encuentran presentes en casi todos los tejidos del organismo, siendo particularmente altas las cantidades de esta enzima en próstata, estómago, hígado, músculo, bazo, eritrocitos y plaquetas (*Manual fabricante Kit Phosphatesmo KM*).
- El método se fundamenta en que la fosfatasa ácida hidroliza los monoésteres del ácido ortofosfórico, tales como el fenil fosfato, en medio ácido con máxima actividad a PH 4,9. El macerado se incuba con el sustrato de fenil fosfato de sodio y el fenol liberado reacciona con el oliazio reactivo de Gomori.
- En caso de dar positivo el ensayo se visualizará un color violeta; de ser negativo (rosado u otro) se descarta la presencia de semen (*Manual fabricante kit Phosphatesmo KM*).



Fig.4)- Reacción positiva con el kit fosfatesmo KM

## 2. Ensayos de certeza (estudios microscópicos)

- Este estudio es utilizado para visualizar al microscopio la presencia de espermatozoides maduros, poder inferir en la proporción de éstos en nuestra muestra y conocer también el componente epitelial presente en la misma. Éstos son datos muy relevantes a conocer para maximizar posteriores resultados.



Fig. 5)- Vista al microscopio. Tinción Christmas tree

- El hecho de no descubrir un espermatozoide completo no debe llevar a concluir que la mancha no es de esperma.
- La investigación puede resultar negativa por varios motivos:

- Deshidratación de los espermatozoides en la mancha los hace frágiles y se rompen en cabezas y colas que no tienen valor identificativo.
- Los espermatozoides se adhieren tenazmente al tejido, resultando a menudo muy difícil eluirlos.
- El líquido espermático puede no contener espermatozoides (la azoospermia se da en un 2 % de la población y en la senectud es bastante más frecuente).
- La difusión de los espermios en la mancha no es uniforme y cuando empleamos técnicas de tinción directa del tejido manchado, se corre el riesgo de investigar una parte donde no existen espermios.

En el caso que el indicio recibido sea un cabello, primero se visualizará microscópicamente si es humano, en caso afirmativo se observará la presencia u ausencia de bulbo, ya que de allí es de donde se extrae el ADN nuclear. Si el cabello no cuenta con bulbo no es factible de que se realice dicho análisis.

Su valor como indicio es apreciable dada su resistencia y perdurabilidad.

Los problemas médico- legales en los que el análisis del pelo juegan un papel destacado, están relacionados con:

- Delito de lesiones: riñas, accidentes de todo tipo, homicidios.
- Delitos contra la libertad sexual: violaciones, abusos deshonestos.
- Problemas de identificación de personas desconocidas en descuartizaciones o en posibles diagnósticos diferenciales que se plantean en relación con distintos animales.
- Intoxicaciones (estudio realizado en el Laboratorio Químico de la Policía Técnica) algunos tóxicos minerales como el plomo, arsénico o talio pueden ser investigados en el pelo cuando ya han desaparecido en otros puntos del organismo.

Frecuentemente, el objetivo que se persigue con el estudio del pelo encontrado en la escena del crimen es la identificación de un sospechoso, su asociación con los hechos, la relación con la víctima y con el arma empleada o la implicancia de un vehículo en el crimen.

El pelo consta de un bulbo o raíz, el cuerpo y la extremidad libre.

El cuerpo crece desde la raíz hasta la extremidad libre y está compuesto de cutícula, corteza y la médula (en una sección transversal).

La cutícula está formada por escamas superpuestas y termina en un punto, orientado siempre hacia la extremidad libre del pelo.

La corteza consiste en células planas y alargadas, las que le dan flexibilidad.

La médula está compuesta de varias capas de células. La matriz del color del pelo se encuentra en la corteza y en la médula.

Realizando un examen preliminar del pelo se puede determinar si se trata (en humanos) de cabellos caídos, ya que se observará una raíz contraída (arrugada); si es arrancado, la raíz será completa. También puede haber sido roto. Cualquiera de estas condiciones puede implicar que el cabello fue arrancado, en por ejemplo una lucha. La presencia de pliegues agudos o roturas en el medio del cabello, puede indicar que fue roto por un arma. Por lo tanto, una persona que haya sido golpeada en la cabeza, presentará a menudo muchos cabellos rotos y aplastados.

La apariencia general del cuerpo del pelo es de significación; si el pelo consta de un diámetro uniforme, es casi seguro que se trata de un cabello. Si es rizado y de diámetro variable, se tratará posiblemente de un bello del cuerpo. De acuerdo al largo, se puede deducir la parte del de la cual probablemente proviene.

Para realizar un examen microscópico descriptivo, los pelos se montan en forma seca sobre porta objetos (una vez lavados si es necesario), cubiertos con cinta adhesiva transparente, y se realiza una descripción microscópica, definiéndose las siguientes características:

Color: rubio, castaño, cano

Tonalidad: claro, oscuro

Características medulares: sin médula, vestigial, fragmentaria, continua

Cutícula: no visible, poco definida, definida.

El pelo animal muchas veces es importante como evidencia física, y su diferenciación del pelo humano, así como su identificación en cuanto a especie, son materias muy importantes. La base

para distinguir el pelo humano y animal puede resumirse en las siguientes características expresadas en el esquema:

### HUMANO

Médula	Cutícula
-Red aérea finamente granulosa	-Escamas delgadas, poco salientes y muy imbricadas.
-Células medulares invisibles, sin disociación	
-Índice medular inferior a 0,30 micras	
-Pelos del vello fetal desprovistos de médula	

### ANIMAL

Médula	Cutícula
-Contenido aéreo de vesículas más o menos voluminosas.	-Escamas gruesas, salientes y poco imbricadas.
-Células medulares muy aparentes.	
-Índice medular superior a 0,50 micras	
-Forma un cilindro hueco bastante delgado	
-Pigmentación con granulaciones irregulares siempre mayor que en el hombre	

Mediante el examen microscópico, establecer si los pelos pertenecen a un individuo determinado es una tarea prácticamente imposible. Pueden encontrarse mayores diferencias entre pelos del mismo individuo, que entre pelos de distintas personas, por lo que no puede irse más allá de decir que los pelos son similares.

Cuando se reciben huesos, en general se seleccionan si es posible piezas óseas de tejido compacto, como la diáfisis de los huesos largos. Este tipo de hueso presenta, por lo general un mejor estado de conservación del ADN, con respecto a los huesos esponjosos o traverculados, como las vértebras. Los procedimientos específicos para su acondicionamiento se detallan en el anexo I.

En el caso que la muestra recibida sea músculo u otro tejido se procede a seleccionar un fragmento del material a analizar de aproximadamente 1-2 gr. evitando en lo posible las porciones ricas en tejido graso. En caso de trabajar con músculo, retirar con bisturí la piel y el tejido subcutáneo, con el fin de descubrir la capa muscular profunda, cuyo estado de conservación, y por lo general, es más adecuado. Posteriormente se disgrega el tejido sobre una placa de petri hasta reducirlo en pequeños fragmentos y se congela dejándolo listo para una posible extracción de ADN.

Si los ensayos antes mencionados lo ameritan, se procederá a realizar sobre las muestras los siguientes pasos:

### *1- Extracción.*

Con la extracción se busca sacar el material genético del interior celular gracias a la ruptura de la membrana citoplasmática y finalmente la membrana nuclear. Los diversos procedimientos de extracción tienen una doble misión: extraer y purificar. El método que se utiliza en este Laboratorio es el de extracción orgánica (fenol-cloroformo).

En criminalística, el proceso de extracción es el paso más importante en el análisis de la muestra ya que en la mayoría de los indicios criminales por su naturaleza suelen estar contaminados y/o degradados; y ante todo porque siempre son únicos e irrepetibles. Si este paso no es hecho correctamente, se pueden acarrear sustancias contaminantes (químicas o biológicas) que podrían interferir con la acción de diversas enzimas (restricoras, polimerasas) imposibilitando los estudios.

Los protocolos de extracción del ADN difieren según la naturaleza de la muestra a analizar.

#### **1.1) Extracción de ADN (manchas de sangre)**

## 1.2) Extracción Diferencial del ADN en hisopos vaginales

## 1.3) Extracción de ADN nuclear en pelos

## 1.4) Extracción de ADN de hueso

1.5) **Extracción de tarjetas FTA (sangre y saliva):** Cuando se toma una muestra indubitada (de la cual se sabe sin ninguna duda su procedencia) lo más adecuado y por lo general se deposita en las llamadas tarjetas FTA, las cuales cumplen con los requisitos para mantener adecuadamente y en condiciones a la muestra.

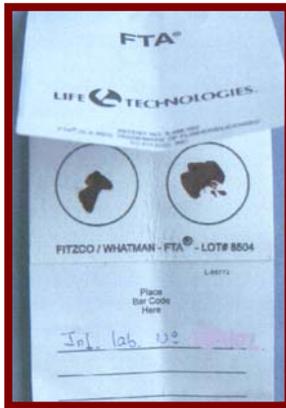


Fig. 6)- Muestra de sangre depositada en tarjeta FTA. Fig.7)- Recorte de muestra e instrumentos utilizados

## 2. Purificación.

3. **Cuantificación:** La cantidad de ADN que se tiene es muy importante a la hora de la amplificación por PCR ya que el exceso o defecto en la cantidad empleada puede dar resultados negativos o dificultad en la lectura e interpretación de los resultados.

En este laboratorio la técnica utilizada para cuantificar el ADN es por medio del uso de geles de agarosa con bromuro de etidio, que paralelamente a la cuantificación ofrece información sobre la calidad del ADN antes de proceder a su estudio.

El ADN obtenido en todos los procedimientos se analiza en geles de agarosa al 0,8 %, con bromuro de etidio (30  $\mu$ l en 80 ml de gel) en buffer TBE 1x a 4V/cm. Se visualiza con Luz UV, utilizando un transiluminador a los efectos de:

*-semicuantificar el ADN* en base a la fluorescencia emitida

-**Inferir sobre la integridad del ADN:** si el ADN de la muestra no se encuentra degradado se observará una única banda en el gel de alto peso molecular (para ello se corre también, junto con las muestras, patrones de peso molecular). De lo contrario si el ADN se encuentra degradado se observará en el gel una imagen dispersa correspondiente a fragmentos de distinto peso molecular.

-**Observar si existe contaminación bacteriana:** en este caso se verá fluorescencia correspondiente a ARN por delante del frente de corrida y eventualmente ARN ribosomal (16S y 23S).

4. **Amplificación:** Luego de cuantificada la muestra se procede a la amplificación mediante **multiplex PCR** que permite copiar o multiplicar fragmentos (alelos) de ADN de distintos loci determinados, un número finito de veces (hasta que haya cantidad suficiente como para poder ser analizado o detectado). Se procederá de acuerdo al protocolo recomendado por el manual técnico del sistema "Gene Print Power Plex 16" (Promega).

5. **Tipificación (genotipado):** Una vez amplificadas las muestras, se procede a la tipificación del ADN, basada en los polimorfismos de los marcadores STRs; mediante el uso del analizador genético ABI PRISM 310 (también utilizado por los laboratorios del FBI).

El hardware localizado dentro del ABI PRISM 310, es responsable de:

- Manejo automático de las muestras (región autosampler). El autosampler provee el mecanismo para mover la bandeja, que contiene cada tubo con su muestra, con el fin de ponerlos en contacto con el capilar (fig. 9-10).
- Electroforesis (región de la bomba del bloque). La región de la bomba del bloque controla el llenado del capilar, mediante el empleo de una jeringa, la cual almacena el polímero entre las corridas y genera la fuerza suficiente para rellenar el capilar con polímero. Además consta de un reservorio, el cual contiene el buffer requerido para la electroforesis.

Detección de fluorescencia (región de detección). El sistema de detección colecta datos desde las muestras, al pasar éstas por el detector del láser, durante su migración. El láser

excita los fluorocromos con que fueron marcadas las muestras, y su fluorescencia es detectada por la cámara CCD (Charge – Coupled – Device). (Fig 9).



Fig. 8)- Equipo ABI PRISM

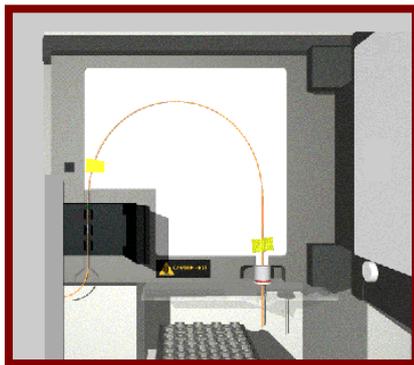


Fig.9-10) Interior del ABI PRISM

En este laboratorio se utiliza un kit, llamado *Sistema Power Plex 16* (diseñado específicamente para ser usado con el analizador genético ABI PRISM 310 y es compatible con el ABI PRISM 377 secuenciador ADN), que aporta todos los elementos necesarios para la amplificación (excepto la taq polimerasa) y para la detección de los 16 loci (15 loci STRs más el locus de la Amelogenina) mediante tres colores (azul, verde, amarillo) (*Technical Manual Power Plex 16, 2003*).

Este Sistema contiene:

- Un primer específico para los loci STRs *Penta E, D18S51, D21S11, TH01 y D3S158*. Este iniciador es identificado ya que posee un marcaje con fluoresceína (FL).

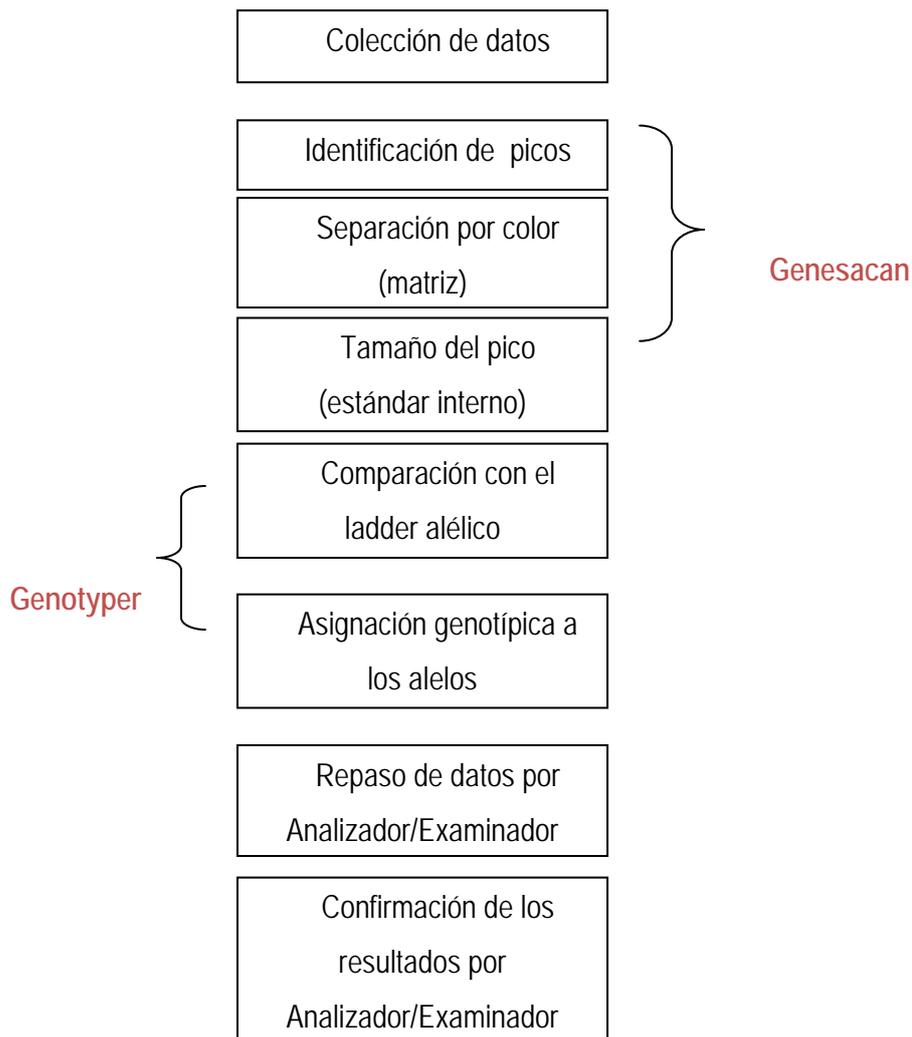
- Un primer específico para los *loci FGA, TPOX, D8S1179, vWA y la Amelogenina*. Estos son identificados mediante el marcaje con carboxy-tetra-metilrodamina (TMR).
- Un primer específico para los loci STRs *Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317 y D5S818* evidenciados gracias al marcado con 6-carboxy-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxi-fluoresceína (JOE).

Cabe destacar que 13 de estos loci fueron seleccionados por el FBI y luego se le agregaron los loci pentanucleótidos (Penta E y Penta D) muy polimórficos ideales para la evaluación de mezclas frecuentemente encontradas en casos forenses. Finalmente se agregó el locus de la Amelogenina para la determinación del sexo.

Los 16 loci son amplificados simultáneamente en el mismo tubo y analizados en una única inyección.

- Estándar interno (*ILS600*), detectado como un cuarto color (rojo) que consta de 22 fragmentos de ADN de distintos tamaños y marcados individualmente con carboxi-x-rodamina. Este es el encargado de asignar tamaños según el tiempo de corrida electroforética.
- Un ladder, el cual contiene todos los posibles alelos, es decir que tiene todos los fragmentos (con sus respectivos tamaños) equivalentes a todos los posibles alelos encontrados para cada locus. Los datos recabados por el ABI 310 son en forma de picos (electroferograma). Este aparato es el encargado de correlacionar la intensidad de la señal fluorescente emitida por los fluorocromos excitados por el láser en cada muestra, versus el paso del tiempo.

El proceso del genotipado para la determinación de los alelos STRs presentes es el siguiente:



El **Genescan** es un software que permite determinar los alelos mediante la comparación de los fragmentos presentes en la muestra con respecto al ladder alélico y al estándar interno; mientras que el software **Genotyper** es el responsable de la designación de los alelos. (*Manual de curso de postgrado en estadística aplicada a Genética Forense, 2002*).

Primeramente los colores (fragmentos marcados con fluorocromos) son separados, y los picos representan fragmentos de ADN que son identificados y asociados con el color apropiado.

A los fragmentos de ADN luego se le asigna el tamaño al compararlo con el estándar interno.

Finalmente, los productos de PCR ya con los tamaños asignados son correlacionados con el ladder alélico. Este último contiene alelos de repeticiones conocidas, y es usado mucho como una guía de

medición que relaciona los tamaños de los productos de PCR, con el número de unidades repetidas presentes para cada locus STR.

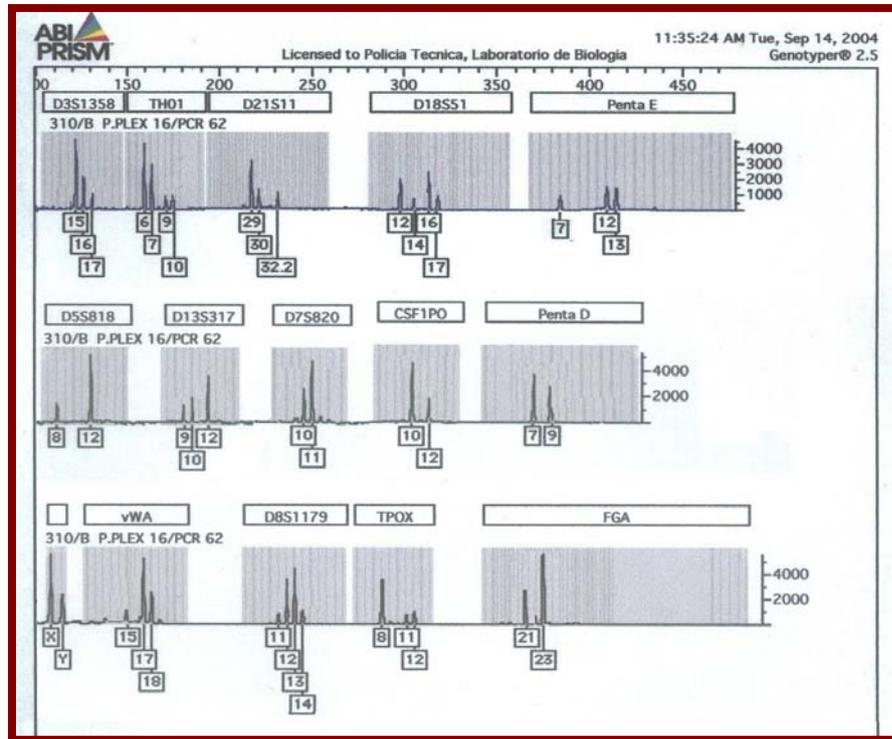


Fig.11) Electroferograma (se observa para los diferentes sistemas de marcadores, un perfil mezcla)

Se hace referencia con el término "perfil mezcla" en genética forense, cuando aparecen más de dos alelos (representados como picos en el electrofenogramas) indicando la presencia de más de un individuo. Los picos además suelen estar desbalanceados, es decir unos con mayor intensidad que otros.

Los pasos a dar para identificar una mezcla (según Clayton, 1998) son las siguientes:

- Identificar la presencia de una mezcla. Designar los alelos sin ambigüedad
- Identificar el número posible de contribuciones de la mezcla
- Estimar la proporción relativa de los individuos que componen la mezcla y las combinaciones posibles de genotipos

- Comparar los perfiles genéticos obtenidos en las muestras de referencia
- Valoración de los resultados obtenidos y cálculos estadísticos si procede.

El cumplimiento de estos pasos es posible gracias a un operador que realiza una primera lectura del perfil genético y elimina los artefactos claros y luego lo edita en el Genescan. Con Genotyper se asignan los alelos y la altura de todos los picos.

Finalmente se procede a comparar el perfil mezcla con los perfiles genéticos de víctima y sospechoso/s y se determina si están presentes en la muestra.

#### *6. Cálculos estadísticos si amerita.*

#### *7. Confección del informe correspondiente*

Si dicha persona no queda excluida como posible agresor, se procederá a los cálculos estadísticos con base en equilibrio *Hardy-Weinberg*.

En el caso de ocurrir una violación como la que se estudiará más adelante, si se comprobó que efectivamente se trata de un perfil mezcla, se conoce el número de contribuyentes en la muestra y se compara con los perfiles de referencia, se tratará en este paso de valorar la fuerza de la asociación y se asignará un valor numérico a los resultados dependiendo de las hipótesis planteadas.

Para el cálculo de este coeficiente se asume:

- que exista independencia de loci
- que los marcadores están en equilibrio Hardy-Weinberg
- Y que no existe relación de parentesco genético entre los individuos de la mezcla.

A posterior se aplicará el LR referido a la mezcla de dos individuos (por ser la de mayor incidencia en la casuística) y teniendo en cuenta que la muestra fue tomada del cuerpo de la víctima (hisopado vaginal con semen), quedando claro que en dicha muestra se encuentran presentes células descamativas del epitelio vaginal (pertenecientes a la víctima) y restos espermáticos (agresor).

De esta manera lo que habrá que calcular es la compatibilidad del sospechoso.

Se plantean dos hipótesis mutuamente excluyentes para el cálculo del LR:

- H1: la muestra es una mezcla de la víctima y el sospechoso
- H2: la muestra es una mezcla de la víctima y una persona al azar de la población en estudio

$$\text{LR} = \frac{\text{víctima} + \text{sospechoso}}{\text{víctima} + \text{otra persona desconocida}}$$

(La tabla de frecuencias alélicas utilizada posteriormente para los cálculos estadísticos fue creada por personal Técnico de este Laboratorio en base a datos recabados de distintos casos forenses en donde los individuos que intervinieron en los mismos carecían de relación de parentesco).

Para el caso en que la muestra sea de pelos, el LR se transforma en lo que se llama *índice de identidad* y se torna un cálculo más sencillo.

A partir de éste índice (LR) se calcula la probabilidad de coincidencia o de Match:

$$\% = \frac{\text{LR}}{\text{LR} + 1} \times 100$$

(Normas internacionales plantean una exigencia de Match igual o superior al 99,9% para considerar un resultado como "probado")

## *Resultados y discusión de casos forenses*

A continuación se describirán cinco casos forenses, representativos de los que he participado y de los que día a día acontecen. La descripción de estos casos seguirá el formato de informes que utiliza el Laboratorio Biológico de Policía Técnica para expedir un caso concluido hacia el Juez interviniente en la causa. Cabe destacar que por razones de confidencialidad, los nombres fueron sustituidos por letras y demás otros datos de su procedencia fueron cambiados, pero no así el contenido de los indicios recibidos ni los análisis realizados.

## INFORME: Caso N° 1: Clínica de Abortos

### CAPÍTULO I - Antecedentes del caso criminal

Inspección a presunta Clínica de Abortos.

Referencia: Oficio s/Nº, Jefatura de Policía de Canelones.

### CAPÍTULO II - Material recibido para estudio:

1. Dubitado:

art.3.- un envoltorio de papel rotulado "*MUESTRA DUBITADA LEVANTADA DEL LUGAR – HISOPO*" conteniendo un hisopo con capuchón plástico protector presentando una mancha pardo rojiza en su extremo.

art.4.- un sobre de manila rotulado "*Jefatura de Policía de Canelones – Policía Técnica – MUESTRA DUBITADA – lugar del hecho*" conteniendo una compresa, presentando manchas pardas por su superficie.

2. Indubitado:

art.1.- un envoltorio de papel rotulado "*MUESTRA INDUBITADA DE LA SOSPECHOSA N1*" conteniendo media tarjeta FTA rotulada "*S1*" presentando sangre en ambos círculos.

art.2.- un envoltorio de papel rotulado "*MUESTRA INDUBITADA DE LA SOSPECHOSA N2*" conteniendo media tarjeta FTA rotulada "*S2*" presentando sangre en ambos círculos.

art.5.- una conservadora rotulada "*PRESUNTOS RESTOS FETALES*" conteniendo al parecer un trozo de extremidad inferior de un feto.

### CAPÍTULO III – Objeto del estudio

Se trata de establecer:

1. Si las manchas presentes en el hisopo (art.3) y en la compresa (art.4) remitidos son de sangre humana.
2. Si 1. es positivo la tipificación por ADN (ácido desoxirribonucleico) de las muestras remitidas y su posterior comparación con las muestras indubitadas de las sospechosas (arts. 1 y 2) y con los restos fetales (art.5).

#### CAPÍTULO IV – Operaciones realizadas

A los fines aludidos se efectuaron las siguientes operaciones:

1. Se realizó el ensayo de probabilidad de sangre, (Reactivo de Adler), en las manchas presentes en el hisopo (art.3) y en la compresa (art.4) remitidos, obteniéndose:
  - Resultado negativo para el hisopo (art.3)
  - Resultado positivo para la compresa (art.4)
2. Se realizó observación microscópica al macerado acuoso del corte realizado en las manchas pardas presentes en la compresa (art.4), utilizando la técnica de Reacción de Teichmann, obteniéndose resultado positivo.
3. Se realizó el ensayo de especie sanguínea, utilizando el kit para sangre humana DIASPOT (el cual detecta hasta 50ng/ml) para las manchas pardas presentes en la compresa (art.4) remitida, obteniéndose resultado positivo.
4. Se extrajo el ADN a las muestras de sangre de las sospechosas (arts. 1 y 2) remitidas según protocolo del fabricante de tarjetas FTA.
5. Se extrajo el ADN a la sangre presente en la compresa (art.4) y a los restos fetales (art.5) remitidos según protocolo del FBI.
6. El ADN extraído se purificó y concentró utilizando los sistemas Microcom 100.
7. Se analizaron mediante electroforesis capilar, previa amplificación por PCR, y utilizando un analizador Genético ABI 310, los siguientes loci: D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, Penta E, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D, D8S1179, TPOX, FGA y Amelogenina (para determinación de sexo).

CAPÍTULO V –Resultados

- En el estudio de ADN se obtuvieron los siguientes resultados:

	Sospechosa "S1"(art.1)	Sospechosa "S2"(art.2)	Restos fetales (art.5)	Sangre presente en compresa (art.4)
D3S1358	15/17	17/18	18	15/18
TH01	7/9	7	6/7	6/10
D21S11	25.2/31.2	30	29/30	31.2/32.2
D18S51	18/19	12/15	14/15	14
Penta E	7/12	7/13	13/15	7
D5S818	13	12	12/13	11/12
D13S317	9/12	9/10	9/12	8/11
D7S820	10/11	10/11	9/11	9/10
D16S539	9/11	11	11	8/10
CSF1P0	10/11	10/12	10/12	12
Penta D	9/13	9/15	9/13	9/12
SEXO	X	X	X	X
D8S1179	12/14	12/13	13	13
TPOX	8	8	8/9	11
FGA	20/21	21/26	25/26	20/21

## CAPÍTULO VI – Conclusiones

1. La mancha pardo rojiza presente en el hisopo (art.3) mencionada en el Capítulo II no es de sangre.
2. Las manchas pardas presentes en la compresa (art.4) mencionada en el Capítulo II son de sangre humana.
3. Del análisis de ADN realizado a la sangre presente en la compresa (art.4), utilizando marcadores autosómicos, se obtuvo un perfil genético femenino único y distinto a los demás analizados.
4. Del análisis de ADN realizado a la sospechosa "S1" (art.1), utilizando marcadores autosómicos, se obtuvo un perfil genético femenino único y distinto a los demás analizados.
5. Del análisis de ADN realizado a los restos fetales (art.5), utilizando marcadores autosómicos, se obtuvo un perfil genético femenino único.
6. En todos los sistemas investigados hay inclusión de vínculo entre hija (restos fetales, art.5) y madre (sospechosa "S2" (art.2)) alegada. El Índice de maternidad es  $IM = 127599$ , y la probabilidad de que "S2" sea la madre biológica del feto es del 99,999%.-

## CAPÍTULO VII – Destino del material

1. Se conservan en este Laboratorio contramuestras de los indicios periciados, los cuales quedan archivados en este Departamento en un sobre rotulado como Caso N° 1.
2. Los indicios periciados quedan en este Departamento a disposición de la Jefatura de Policía de Canelones hasta ser retirados por la misma.

Saluda a usted atentamente,

*Natalia Sandberg*

## INFORME: Caso N° 2: Sangre Humana, estudio de cromosomas autosómicos

### CAPÍTULO I - Antecedentes del caso criminal

Homicidio.

Referencia: Oficio s/N°, Jefatura de Policía de Maldonado.

### CAPÍTULO II - Material recibido para estudio:

1. Dubitado:

art.2.- un envoltorio de papel rotulado *"MUESTRA DUBITADA LEVANTADA DEL LUGAR – TARJETA FTA E HISOPO"* conteniendo media tarjeta FTA presentando manchas pardo rojizas en ambos círculos y un hisopo con capuchón plástico protector presentando una mancha pardo rojiza en su extremo.

art.3.- un sobre de manila rotulado *"Jefatura de Policía de Canelones – Policía Técnica – Buzo del Agresor"* conteniendo un buzo deportivo tipo canguro, de color azul, con dos franjas negras verticales en ambos laterales de la delantera y dos franjas negras con tres rayas blancas verticales en ambos antebrazo, luciendo la inscripción *"Adidas"* en letras negras y el logo de la marca en fondo negro con dibujo y letras en color azul en la parte superior de la delantera, sin talle, presentando manchas pardas en la zona correspondiente a la región anterior del antebrazo derecho y manchas pardo rojizas en la zona correspondiente a las regiones anterior del antebrazo izquierdo (del lado interior y exterior) y región lumbar izquierda, presentando además abundante suciedad.

2. Indubitado:

art.1.- un envoltorio de papel rotulado *"MUESTRA INDUBITADA LEVANTADA DEL CUERPO DE LA VÍCTIMA - TARJETA FTA E HISOPO"* conteniendo media tarjeta FTA rotulada *"A1"* presentando sangre en ambos círculos y un hisopo con capuchón plástico protector presentando sangre en su extremo.

### CAPÍTULO III – Objeto del estudio

Se trata de establecer:

1. Si las manchas presentes en la tarjeta (art.2) y en el buzo (art.3) remitidos son de sangre humana.
2. Si 1. es positivo la tipificación por ADN (ácido desoxirribonucleico) de las muestras remitidas y su posterior comparación con la muestra indubitada de la víctima (art.1).

### CAPÍTULO IV – Operaciones realizadas

A los fines aludidos se efectuaron las siguientes operaciones:

1. Se realizó el ensayo de probabilidad de sangre, (Reactivo de Adler), en las manchas presentes en la tarjeta FTA (art.2) y en el buzo (art.3) remitidos, obteniéndose resultado positivo para ambos artículos.
2. Se realizó el ensayo de especie sanguínea, utilizando el kit para sangre humana DIASPOT (el cual detecta hasta 50ng/ml) para las manchas presentes en la tarjeta FTA (art.2) y el buzo (art.3) remitidos, obteniéndose resultado positivo para ambos artículos.
3. Se extrajo el ADN a las muestras de sangre presentes en las tarjetas FTA (arts.1 y 2) remitidas según protocolo del fabricante de tarjetas FTA.
4. Se extrajo el ADN a las manchas de sangre presentes en el buzo (art.3) remitido según protocolo del FBI.
5. El ADN extraído se purificó y concentró utilizando los sistemas Microcom 100.
6. Se analizaron mediante electroforesis capilar, previa amplificación por PCR, y utilizando un analizador Genético ABI 310, los siguientes loci: D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, Penta E, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D, D8S1179, TPOX, FGA y Amelogenina (para determinación de sexo).

## CAPÍTULO V –Resultados

- En el estudio de ADN se obtuvieron los siguientes resultados:

	Indubitada de la víctima "A1" (art.1)	Sangre presente en la tarjeta FTA (art.2)	Sangre presente en el buzo (art.3)
D3S1358	16	16	15/17
TH01	7/9	7/9	6/7
D21S11	30	30	30/30.2
D18S51	16/19	16/19	14/15
Penta E	5/12	5/12	10
D5S818	9/11	9/11	10/11
D13S317	12/13	12/13	12
D7S820	9/12	9/12	10/12
D16S539	10/11	10/11	9/10
CSF1P0	10/11	10/11	10/11
Penta D	9/14	9/14	10/13
SEXO	XY	XY	XY
D8S1179	14/15	14/15	10/12
TPOX	9/11	9/11	8
FGA	21/25	21/25	22/24

## CAPÍTULO VI – Conclusiones

1. Las manchas pardo rojizas presentes en la tarjeta FTA (art.2) y el buzo (art.3) mencionados en el Capítulo II son de sangre humana.
2. Las manchas de sangre presentes en la tarjeta FTA (art.2) presentan idéntico perfil genético que el de la víctima "A1" (art.1). El índice de identidad entre la sangre presente en la tarjeta FTA (art.2) y la de la víctima es de  $3,12 \times 10^{18}$ .

3. La probabilidad de que la sangre presente en la tarjeta FTA (art.2) pertenezca a la víctima "A1" es mayor al 99,9999%.
4. Las manchas de sangre presentes en el buzo (art.3) presentan un perfil genético masculino diferente al de la víctima "A1" (art.1).

## CAPÍTULO VII – Destino del material

3. Se conservan en este Laboratorio contramuestras de los indicios periciados, los cuales quedan archivados en este Departamento en un sobre rotulado como Caso N°2.
4. Los indicios periciados quedan en este Departamento a disposición de la Jefatura de Policía de Maldonado hasta ser retirados por la misma.

Saluda a usted atentamente,

*Natalia Sandberg*

## INFORME: Caso N° 3: Paternidad: estudio de cromosomas autosómicos en hueso y saliva

### CAPÍTULO I - Antecedentes del caso criminal

Investigación de Paternidad.

Referencia: Oficio N° 129/2009, Comisaría 4ta.

### CAPÍTULO II - Material recibido para estudio:

1. Dubitado:

- No se reciben.

2. Indubitado:

art.1.- una bolsa de nylon conteniendo un trozo de fémur, perteneciente a quien en vida fuera "A1".

-Con fecha 23/03/09 se extrajeron muestras de saliva a las siguientes personas:

art.2.- "B1" (hijo en cuestión).

art.3.- "C1" (Madre biológica).

### CAPÍTULO III – Objeto del estudio

Se trata de establecer:

1. La tipificación por ADN (ácido desoxirribonucleico) de las muestras remitidas.
2. En base a las tipificaciones realizadas, establecer si "A1" es el padre biológico de "B1".

### CAPÍTULO IV – Operaciones realizadas

A los fines aludidos se efectuaron las siguientes operaciones:

1. Se extrajo el ADN a las muestra de saliva de "B1" y "C1" según protocolo del

fabricante de las tarjetas FTA.

2. Se extrajo el ADN al trozo de fémur (art.1) remitido según protocolo del FBI.
3. El ADN extraído se purificó y concentró utilizando los sistemas Microcom 100.
4. Se analizaron mediante electroforesis capilar, previa amplificación por PCR, y utilizando un analizador Genético ABI 310, los siguientes loci: D3S1358, TH01, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, vWA, D8S1179, TPOX, FGA y Amelogenina (para determinación de sexo) para la muestra de sangre de Guillermo Cardozo.

## CAPÍTULO V –Resultados

1. En el estudio de ADN se obtuvieron los siguientes resultados:

	Trozo de Fémur (art.1) "A1"	Madre biológica "C1"	Hijo en cuestión "B1"
D8S1179	14/15	14	14
D21S11	28/32.2	29/30	29/32.2
D7S820	11	8/10	8/11
CSF1PO	12	10/12	12
D3S1358	15	17	15/17
TH01	9.3	9/9.3	9.3
D13S317	11/13	9/12	11/12
D16S539	11/14	11/13	11
vWA	16/17	16/17	16/17
TPOX	11/12	8	8/12
D18S51	14/18	14/17	14/18
SEXO	XY	X	XY
D5S818	11/12	13/14	12/13
FGA	21/22	24	21/24

## CAPÍTULO VI – Conclusiones

1. En todos los sistemas investigados hay inclusión de vínculo entre hijo y padre alegado. El Índice de Paternidad es  $IP = 2626217$ , y la probabilidad de que "A1" sea el padre biológico de "B1" es del 99,9999%.-

## CAPÍTULO VII – Destino del material

1. Se conservan en este Laboratorio las muestras de saliva extraídas y contramuestras de los restos óseos, los cuales quedan archivados en este Departamento en un sobre rotulado como Caso N° 3.

Saluda a usted atentamente,

*Natalia Sandberg*

## INFORME: Caso N° 4: Violación, estudio de cromosoma Y y autosómicos.

### CAPÍTULO I - Antecedentes del caso criminal

Homicidio y presunta violación.

Referencia: Oficio N° 874/2009, Jefatura de Policía de Artigas.

### CAPÍTULO II - Material recibido para estudio:

1. Dubitado:

- un sobre de papel luciendo el sello de la "JEFATURA DE POLICÍA DE ARTIGAS" rotulado "DIRECCIÓN NACIONAL DE POLICÍA TÉCNICA – DEPARTAMENTO DE LABORATORIO BIOLÓGICO – CONTIENE: Oficio N° 874/2009 con cinco sobres con hisopo de menor fallecido A1 y de B1 – REMITE: Jefatura de Policía de Artigas" conteniendo:

art.1.- un sobre de papel luciendo el sello de "JEFATURA DE POLICÍA DE ARTIGAS" rotulado "Hisopo con 1ª muestra margen anal menor: A1" conteniendo un hisopo presentando una mancha amarronada en su extremo.

art.2.- un sobre de papel luciendo el sello de "JEFATURA DE POLICÍA DE ARTIGAS" rotulado "Hisopo con 2ª muestra margen anal menor: A1" conteniendo un hisopo presentando una mancha amarronada en su extremo.

art.3.- un sobre de papel luciendo el sello de "JEFATURA DE POLICÍA DE ARTIGAS" rotulado "Hisopo con 3ª muestra margen anal menor: A1" conteniendo un hisopo presentando una mancha amarronada en su extremo.

art.4.- un sobre de papel luciendo el sello de "JEFATURA DE POLICÍA DE ARTIGAS" rotulado "Hisopo con 4ª muestra anal menor: A1" conteniendo un hisopo presentando una mancha amarronada en su extremo.

3. Indubitado:

art.5.- un sobre de papel luciendo el sello de "JEFATURA DE POLICÍA DE ARTIGAS" rotulado "Hisopos Bucales de B1" conteniendo dos hisopos con muestra de saliva,

como pertenecientes al sospechoso.

### CAPÍTULO III – Objeto del estudio

Se trata de establecer:

1. Si las manchas amarronadas presentes en los hisopos (arts.1, 2, 3 y 4) remitidos contienen semen.
2. En caso de 1. positivo, la tipificación por ADN (ácido desoxirribonucleico) de las muestras remitidas y su posterior comparación con la muestra indubitada del sospechoso (art.5).

### CAPÍTULO IV – Operaciones realizadas

A los fines aludidos se efectuaron las siguientes operaciones:

1. Se realizó el ensayo de probabilidad de semen al macerado acuoso del corte realizado en las manchas amarronadas presentes en los hisopos (arts.1, 2, 3 y 4) remitidos con papel de prueba PHOSPHATESMO KM para la identificación de fosfatasa ácida, obteniéndose resultado positivo para todos los artículos.
2. Se realizó búsqueda microscópica de espermatozoides al macerado acuoso del corte realizado en las manchas amarronadas presentes en los hisopos (arts.1, 2, 3 y 4), utilizando la técnica de tinción de Christmas Tree (modificada por Gram), visualizándose espermatozoides y células epiteliales en todos los artículos.
3. Se extrajo el ADN a la muestra de saliva (art.5) según protocolo del fabricante de las tarjetas FTA.
4. Se extrajo el ADN al semen presente en el hisopo (art.1) según protocolo del FBI, empleándose técnica de extracción diferencial para separar el ADN de las células epiteliales, producto de descamación, del ADN contenido en los espermatozoides.
5. El ADN extraído se purificó y concentró utilizando los sistemas Microcon 100.
6. Se analizaron mediante electroforesis capilar, previa amplificación por PCR, y utilizando un analizador Genético ABI 310, los siguientes loci del cromosoma Y: DYS391, DYS389I, DYS439, DYS389II, DYS438, DYS437, DYS19, DYS392, DYS393, DYS390, DYS385.
7. Se analizaron mediante electroforesis capilar, previa amplificación por PCR, y utilizando un analizador Genético ABI 310, los siguientes loci autosómicos: D3S1358,

TH01, D21S11, D18S51, Penta E, D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, CSF1PO, Penta D, vWA, D8S1179, TPOX, FGA y Amelogenina (para determinación de sexo).

## CAPÍTULO V –Resultados

- En el estudio de ADN se obtuvieron los siguientes resultados:

	Semen presente en el hisopo (art.1)	"B1" (art.5)
DYS391	10	10
DYS389I	13	13
DYS439	12	12
DYS389II	29	29
DYS438	12	12
DYS437	15	15
DYS19	14	14
DYS392	13	13
DYS393	13	13
DYS390	23	23
DYS385	12/13	12/13

	Semen presente en el hisopo (art.1)	"B1" (art.5)
D3S1358	15	15
TH01	6/7	6/7
D21S11	29/30	29/30
D18S51	18/21	18/21
Penta E	8/13	8/13
D5S818	9/12	9/12
D13S317	8/12	8/12
D7S820	10/11	10/11
D16S539	9/11	9/11
CSF1P0	11/13	11/13
Penta D	12	12
SEXO	XY	XY
vWA	17/19	17/19
D8S1179	14	14
TPOX	8/11	8/11
FGA	19/21	19/21

## CAPÍTULO VI – Conclusiones

1. Las manchas amarionadas presentes en los hisopos (arts.1, 2, 3 y 4) mencionados en el Capítulo II son de semen.
2. El perfil genético obtenido del semen presente en el hisopo (art.1) utilizando marcadores autosómicos y marcadores del cromosoma Y es idéntico al perfil genético del sospechoso "B1". El índice de identidad entre el perfil genético obtenido del semen presente en el hisopo (art.1) y el del sospechoso "B1" es de  $2,34 \times 10^{24}$
3. La probabilidad de que el semen presente en el hisopo (art.1) pertenezca al sospechoso "B1" es mayor al 99,9999%.

## CAPÍTULO VII – Destino del material

1. Se conservan en este Laboratorio contramuestras de los indicios periciados, los cuales quedan archivados en este Departamento en un sobre rotulado como Caso N° 4.

Saluda a usted atentamente,

*Natalia Sandberg*

## INFORME: Caso N° 5: Cabellos y estudio con ADN Mitocondrial

### CAPÍTULO I - Antecedentes del caso criminal

Atentado violento al pudor.

Referencia: Oficio N° 074/2009, Seccional 12da.

### CAPÍTULO II - Material recibido para estudio:

1. Dubitado:

-un sobre de papel sellado por el Juzgado, rotulado "contiene: Muestras de pelo de A1" conteniendo:

art.1.- un tubo de plástico rotulado "Juzgado, CABELLOS EN GORRO" conteniendo 5 pelos.

2. Indubitado:

art.2.- un tubo de plástico rotulado "A1" con un hisopo presentando saliva.

### CAPÍTULO III – Objeto del estudio

Se trata de establecer:

1. Si los pelos (art.1) remitidos son de origen humano.
2. Si III.1 es positivo, la tipificación por ADN (ácido desoxirribonucleico) de los cabellos remitidos y la muestra de saliva de "A1" y su posterior comparación.

*Consideraciones previas:* debido a que los cabellos de la evidencia no tienen bulbo es necesario aplicar técnicas de ADN mitocondrial. El ADN mitocondrial humano (ADNmt) es un ADN extranuclear que está presente en las mitocondrias, su secuencia (compuesta por 16.569 pares de bases) fue descrita por primera vez por *Anderson et al.* en 1981.

El ADNmt es heredado estrictamente por vía materna (solo de la madre a los hijos) de forma que todos los miembros de una familia relacionados maternalmente tendrán el mismo tipo de ADNmt.

## CAPÍTULO IV – Operaciones realizadas

A los fines aludidos se efectuaron las siguientes operaciones:

- 1.- Se observaron microscópicamente los pelos (art.1) remitidos, constatándose que:
  - 1.1.- dos de ellos son cabellos castaños de aproximadamente 4,5 con cutícula dañada, sin médula y sin bulbo.
  - 1.2.- dos de ellos son cabellos castaños de aproximadamente 2,5 con cutícula dañada, sin médula y sin bulbo.
  - 1.3.- uno de ellos se trata de un pelo de origen animal
- 2.- Se extrajo el ADN a los cabellos y la muestra de saliva según protocolo del FBI.
- 3.- El ADN extraído se purificó y concentró utilizando los sistemas Microcon 100.
- 4.- Las reacciones de secuenciación para el ADNmt fueron llevadas a cabo en un termociclador 9600 usando el kit de secuenciación cíclica con terminadores de la diclororodamina (Applied Biosystems). Con estas reacciones se consigue averiguar el orden de los nucleótidos que compone la secuencia del ADNmt.
- 5.- Se purifican los productos obtenidos eliminando los terminadores no incorporados por precipitación en etanol.
- 6.- Se realiza una electroforesis capilar en un analizador genético ABI 310, en el cual se separan la secuencia de nucleótidos en el ADNmt y son detectados gracias a la fluorescencia que emiten unos determinados fluorocromos al ser excitados con un láser.
- 7.- Las secuencias obtenidas se comparan con la secuencia de Anderson que sirve como referencia; los resultados obtenidos y las posiciones de los nucleótidos son nombrados en relación con esta secuencia.

## CAPÍTULO V –Resultados

- Análisis de la secuencia del ADN mitocondrial (ADNmt) obtenida para el cabello de la evidencia y para Alfredo Sánchez:

	16129	16185	16193	16223	16249	16311	73	195	200	263	309.1	315.1
"A1"	A	T	del T	T	C	C	G	C	G	G	C	C
Cabello 1	A	T	del T	T	C	C	G	C	G	G	C	C

En la tabla se ha representado las diferencias con respecto a la secuencia de referencia (secuencia de Anderson).

- No se obtuvo ADN analizable del resto de los cabellos.

## CAPÍTULO VI – Conclusiones

1. La probabilidad de que el cabello remitido pertenezca "A1" o a cualquier miembro de su misma línea materna de es del 98,4%.

## CAPÍTULO VII – Destino del material

1. No se conserva contramuestra de los cabellos remitidos (art.1) debido a que los mismos se consumieron en su totalidad durante la pericia realizada.

Saluda a usted atentamente,

*Natalia Sandberg*

## Conclusiones generales

Gracias a esta pasantía, he cumplido mi objetivo de aprender y familiarizarme con la metodología utilizada por el Laboratorio Biológico de Policía Técnica, además de mostrarles un panorama a todos los lectores de dicho trabajo, que seguramente desconocen tanto como yo lo hacía en un principio, la existencia y el desempeño de nuestra policía científica y más precisamente de dicho laboratorio. De hecho, fue tan grato y enriquecedor mi pasaje por aquí, que actualmente me encuentro formando parte del equipo y desempeñando tareas en el mismo. Considero que esta experiencia ha sido de una vital importancia y de un gran aporte a mi carrera de bióloga, ya que me mostró otra rama de aplicación de la genética hasta ese entonces desconocida al menos para mí en nuestro país y seguramente para muchas otras personas también.

Cabe destacar que la metodología utilizada en este laboratorio está a la par de la de avanzados laboratorios del mundo, sin olvidarnos del gran "monstruo" en el tema de investigación Forense como lo es el FBI ("Federal Bureau of Investigation – Department of Justice of the United States"). Si bien los instrumentos y aparatos involucrados en todo el proceso desde la llegada de un indicio y apertura del caso forense hasta la conclusión del mismo, no son los últimos del mercado ni los más avanzados como en otros países, llegamos a la misma efectividad en los resultados.

La tipificación de microsatélites tanto de cromosomas autosómicos como del cromosoma Y, además de la secuenciación del genoma mitocondrial, particularmente con la tecnología automática, es extremadamente útil para la investigación forense rutinaria, dado el excelente rendimiento que se obtiene en cuanto a discriminación e identificación, por lo que constituye, sin duda alguna, un valioso instrumento de trabajo para la investigación pericial en el campo de la Genética Forense.

Gracias al uso de la PCR con primers marcados con fluorocromos y su detección mediante excitación láser, permitió también detectar componentes minoritarios en las mezclas presentes con mayor frecuencia en casos de violación.

El uso del láser para la electroforesis automática también nos posibilita la obtención de información cualitativa y cuantitativa; es decir, permite la asignación de alelos a cada sistema y según la altura de los picos nos da una idea aproximada de la cantidad de ADN que fue amplificado.

Es de vital importancia a la hora de la interpretación de resultados no confundir posibles artefactos con posibles alelos, por ello se establecen ciertas normas generales acerca del límite de sensibilidad de la técnica, como por ejemplo límite de detección de mezclas, balance alélico intralocus.

*Debido a la constante evolución y aplicación de la Genética Forense, día a día son resueltos casos que parecían no tener un final concluyente. La genética Forense ha sido y es, gracias a su actualización constante, un arma muy poderosa por no decir la más poderosa y elegida, siempre que pueda ser aplicada, en la resolución de casos forenses.*

## ANEXO I

### Búsqueda de sangre

#### 1- Diagnóstico presuntivo, Test de la Bencidina (Reacción de Adler)

Reactivos: (solución de bencidina)

Bencidina ----- 0.25 g

Etanol 96<sup>a</sup> ----- 175 ml

Ac. Acético ---- 5-10 gotas

Peroxido de hidrógeno = solución al 3 %

Procedimiento:

Humedecer un hisopo de algodón con agua destilada y pasarlo por la mancha sospechosa, agregar 1 – 2 gotas de solución de bencidina y la misma cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3 %. La aparición de un color turquesa indica reacción positiva.

Notas:

- el color azul aparece de inmediato y es estable durante un cierto tiempo, luego pasa al castaño de intensidad variable según el tenor en hemoglobina.
- Un cambio de coloración previo al agregado de la solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> positivo puede deberse a la presencia de otras sustancias oxidantes en la mancha examinada.

#### 2- Ensayo de Luminol

Reactivos:

Para 100 ml de H<sub>2</sub>O pesar:

- 5 g de carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
- 0.1 g de luminol

#### Preparación:

Pesar la cantidad elegida de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  según el volumen de solución a preparar en un sobre de farmacia. Una vez realizada la pesada, cerrarlo bien y envolverlo en papel de aluminio para protegerlo de la humedad del ambiente, pesar la cantidad elegida de luminol según el volumen de solución a preparar en un trozo del papel de aluminio. Recordar que se debe preparar en el momento de usar.

Medir la cantidad de agua destilada necesaria y trasvasarla en el pulverizador correspondiente al luminol.

Agregar el contenido del sobre de aluminio de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  en el agua destilada y agitar muy bien hasta la disolución completa.

Agregar el contenido del sobre de luminol en la preparación anterior y agitar hasta la disolución total.

Colocar igual volumen de agua oxigenada 10 vol. que el preparado en la solución de luminol carbonato en el atomizador rotulado agua oxigenada.

### 3- Test de Teichmann

#### Procedimiento:

Colocar 1 gota del macerado en agua destilada en un portaobjeto y secar con cuidado procurando no sobrepasar los  $60^\circ$ . Repetir el procedimiento hasta obtener un residuo ligeramente coloreado. Agregar 1 gota de ác. Acético glacial, cubrir con un cubreobjeto procurando no dejar burbujas de aire, repetir el tratamiento térmico y observar al microscopio.

#### Características de los cristales de hemina

Son cristales en formas de prismas alargados, rómbicos, de color café (castaño claro o castaño oscuro), translúcidos.

Notas:

- Se admite que el NaCl sanguíneo provee los cloruros necesarios para la reacción.

## Búsqueda de semen

### 1)- Ensayos de certeza (estudios microscópicos)

a) Examen directo: se recorta un trocito de la muestra y se realiza un macerado acuoso. Al cabo de 30 min. de reposo se realiza una búsqueda al microscopio de espermatozoides maduros (con morfología muy característica que no se confunde con ninguna otra y característica del esperma). Se agita con un palillo estéril el trozo de muestra durante 2 min. Retirar la muestra y centrifugar durante 10 min. a 12.000 rpm. Quedarse con el pellet, retirar el exceso de agua (fase superior), dejando hasta un volumen doble al pellet. Luego tomar una gota y colocarla sobre un porta objeto, colocar un cubre y observar al microscopio a baja intensidad de luz (para minimizar la evaporación y secado por calor de la muestra)

b) Examen por tinción: se procede al frotis del macerado acuoso utilizando la tinción *Christmans Tree* (Gram modificado). Idem que procedimiento anterior con la diferencia que se coloca una gota sobre el porta, se esparce y se coloca en estufa a 56°C durante 30 min. Luego se agrega sobre la muestra el reactivo Nuclear Fast Red y se la coloca en cámara húmeda durante 1 hora. Posteriormente se lava con agua destilada. Finalmente se agrega en ese momento el reactivo Picroindigo Carmine que se deja actuar durante 15 seg. aproximadamente, se lava con alcohol (etanol) y se deja 5 min. en estufa para que este último se evapore.

Los protocolos de extracción del ADN difieren según la naturaleza de la muestra a analizar. Estos serán detallados a continuación.

## Extracciones

### 1.1) Extracción de ADN (manchas de sangre)

- a) Recortar la mancha de sangre:
  - en caso de hisopos aproximadamente la mitad del mismo.
  - en caso de telas recortar 0,5 cm por 0,5 dependiendo de la cantidad de sangre presente.
- b) Colocar en un microtubo de 1,5 ml.
- c) Agregar a la muestra 300  $\mu$ l de buffer de digestión con DTT y 7,5  $\mu$ l de proteinasa K (si el volumen no cubre la muestra se debe agregar 500  $\mu$ l de buffer de digestión y 15  $\mu$ l de proteinasa K).
- d) Agitar suavemente.
- e) Incubar a 56 °C de 18 a 24 hs (ideal 22 hs).
- f) En caso de no contar con tubos con canasto se retira la tela o el trozo de hisopo con un palillo estéril.
- g) Agregar 300  $\mu$ l de la mezcla de alcohol isoamil 24: 24: 1 (siempre en igual cantidad que buffer de digestión), vortexear (hasta la formación de emulsión lechosa) y centrifugar por 10 min. a 10.000 – 15.000 g (hasta que se separen las dos fases).
- h) Se extrae con pipeta adecuada la capa superior y se pasa a un concentrador MICROCOM.
- i) Centrifugar a 3000 rpm, 10 min. observando que filtre todo el contenido.
- j) Lavar el filtro que contiene el ADN con 200  $\mu$ l de agua, centrifugar 10 min. a 3000 rpm.
- k) Repetir el lavado.

- l) Descartar el efluente del microtubo.
- m) Adicionar 50  $\mu$ l de agua al concentrador.
- n) Invertir cuidadosamente el concentrador en un tubo limpio y centrifugar 7 min. a 7000 rpm.

## 1.2) Extracción Diferencial del ADN en hisopos vaginales

- a) La muestra tomada del hisopo, se coloca en un microtubo con cantidad adecuada de agua, dejar macerar a 1 hr. a temperatura ambiente.
- b) Agitar 2 min. con un palillo estéril, retirar el trozo de algodón u otro material y centrifugar 10 min. a 13.000 rpm, descartar el sobrenadante hasta que quede un volumen doble del pellet.
- c) A los 50  $\mu$ l restantes, agregar 500  $\mu$ l de buffer de digestión sin DTT, más 15 $\mu$ l de proteinasa K. Mezclar suavemente. Incubar a 56°C durante 1 h para lisar las células epiteliales.
- d) Centrifugar 5 min. a 10.000 – 15.000, a temperatura ambiente. Separar el sobrenadante a un tubo limpio.
- e) Resuspender el pellet en 500  $\mu$ l de buffer de digestión, vortexear y luego centrifugar 5 min. a 10.000 – 15.000 g a temperatura ambiente. Remover el sobrenadante dejando 50 $\mu$ l.
- f) Repetir ítem 5, una ó dos veces
- g) Resuspender el pellet en 500 $\mu$ l de agua destilada. Vortexear, centrifugar 5 min. a 10.000 – 15.000g. Descartar sobrenadante dejando 50 $\mu$ l. Resuspender el pellet con 50 $\mu$ l.
- h) Adicionar 500 $\mu$ l de buffer de digestión con DTT a los aproximados 50 $\mu$ l de resuspensión de células espermáticas, más 15 $\mu$ l de proteinasa K.

- i) Incubar a 56°C, 2 hrs. (hasta 6 hrs).
- j) Agregar 500 µl de fenol cloroformo, vortexear (hasta que se forme emulsión) y centrifugar de 3 – 5 min, a 10.000 – 15.000 g (hasta separar las dos fases).
- k) Separar la capa superior a un tubo limpio ó al concentrador (MICROCOM). \*\* Se puede hacer una pausa en este punto del procedimiento.
- l) Los pasos siguientes en la purificación son los mismos que para el protocolo de extracción (1.1).

### 1.3) Extracción de ADN nuclear en pelos

- a) En primera instancia se procede al lavado del pelo.
- b) Cortar el pelo a 1 cm. del bulbo aproximadamente.

#### Nota:

- si los pelos se encuentran ensamblados se despegan con xileno o colocándolos 30 min. en el freezer.
- c) Colocar en un microtubo de 1,5 ml.
  - d) Agregar a la muestra 300 µl de buffer de digestión con DTT y 7,5µl de proteinasa K (10 mg/ml).

#### Nota:

- preparación de buffer con DTT: se pesan 0,06 g de DTT y se disuelven en 10 ml de buffer de digestión, mantener a temperatura ambiente (el reactivo preparado dura 15 días).
- e) Agitar con vórtex a baja velocidad 1 seg.
  - f) Incubar a 56°C de 18 a 24 hrs máximo.

- g) Agregar 300  $\mu$ l de fenol cloroformo (siempre en igual cantidad que buffer de digestión), vortexear (hasta la formación de emulsión lechosa) y centrifugar por 10 min. a 10.000 – 15.000 g (hasta que se separen las dos fases).
- h) Separar la capa superior a un tubo limpio, si se desea hacer una pausa o directamente al concentrador si se quiere continuar.
- i) Colocar la muestra en la parte superior del concentrador suavemente.
- j) Los pasos siguientes en la purificación son los mismos que para el protocolo de extracción (1.1).

#### 1.4) Extracción de ADN de hueso

Luego de su llegada a este laboratorio se procede a realizar una limpieza exhaustiva de los mismos que se resume en los siguientes pasos:

- a) Seleccionar el fragmento a analizar y realizar un primer lavado con agua
- b) Cepillado o lijado
- c) Sección y fragmentación de las zonas compactas (diáfisis)
- d) Lavar con solución de hipoclorito de sodio al 10 % y enjuagar con agua
- e) Lavar con etanol y dejar secar en estufa a 37°C durante la noche
- f) Disgregar el tejido óseo en presencia de nitrógeno líquido, por medio de fuertes impactos mecánicos. Como resultado se obtiene la muestra pulverizada.
- g) Tratar la muestra (pulverizada) con 2 ml de la solución de extracción: EDTA 10 mM, Tris 10 mM y ClNa 100 mM, más 1 % SDS. Agregar 10 – 20  $\mu$ l de proteinasa K e incubar a 60°C de 18 a 24 hs.

- h) Agregar el mismo volumen que la solución de extracción de mezcla Fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (25:24:1), vortexear (hasta la formación de emulsión lechosa) y centrifugar por 10 min. A 10.000 – 15.000 g (hasta que se separen las dos fases).
- i) Tomar con pipeta la fracción o fase superior.
- j) Purificar o precipitar el ADN extraído con MICROCOM (similar a protocolos de purificación anteriores).

### 1.5) Extracción de tarjetas FTA (sangre y saliva)

Luego de depositar la muestra en la tarjeta FTA, se deja secar y posteriormente se procede a la extracción.

Se recorta del lugar donde se encuentra la muestra, un circulito de aproximadamente 1 milímetro radio y se lo coloca en un tubo limpio, en el cual se proceden los siguientes lavados de cinco minutos de duración cada uno:

- los tres primeros, son con la solución "FTA purification reagent", se agita el tubo a la mitad y final del tiempo de lavado.
- los últimos dos son con la solución TE-4, se agita únicamente en la mitad del lavado.

## Cuantificación

### 3.1) Preparación en geles de agarosa

- a) Agregar la agarosa pesada, de acuerdo a la concentración requerida, a un erlenmeyer que contenga buffer TBE 1X (vol. final del gel).
- b) Disolver en baño de agua hirviendo, sobre un calefactor, en microondas ó a fuego sobre una plancha de amianto con agitación.

- c) Dejar enfriar la solución a 55 – 60 °C y agregar bromuro de etidio.
- d) Volcar en el molde preparado con el peine.
- e) Dejar solidificar.
- f) Sumergir en la cuba de electroforésis conteniendo buffer TBE1X. Extraer el peine.

### 3.2) Preparación de muestras. Electroforésis.

Sembrar las muestras a cuantificar mezclando 3 µl de loading buffer más 6 µl de cada muestra. Además se siembran 6 µl cada dos muestras de patrones crecientes de peso molecular, para la futura comparación de intensidades permitiendo una estimación de la concentración de las muestras de ADN. Se efectúa una corrida electroforética en buffer TBE1X , a 4 V/cm. Se visualiza con luz UV, utilizando un transiluminador.

La cantidad de ADN que se utilizará para una posterior amplificación se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f$$

### Amplificación

Se prepara una mezcla (MIX) que contiene:

- 9,6 µl H<sub>2</sub>O libre de nucleasas
  - 1,25 µl Gold STR 10X buffer,
  - 1,25 µl primer Pair Mix,
  - 0,4 µl taq. Gold,
- } por muestra (µl).

Como control negativo se utiliza agua libre de nucleasas y como control positivo se utiliza una solución de ADN 9947A.

Los pasos a seguir son los siguientes:

- a) Colocar tarjeta FTA (si las hay).
- b) Colocar vol. de agua correspondiente en cada tubo.
- c) Colocar vol. de MIX correspondiente a cada tubo.
- d) Colocar muestras de ADN.
- e) Llevar a termociclador (Perkin Elmer modelo "Gene Amp PCR System 9600").

## Bibliografía

- Alonso A., Albarran C., Martin P., Garcia P., Sancho M. 1999. Mitochondrial DNA sequencing in forensic casework: sequence and length heteroplasmy and other issues of forensic significance. 18<sup>th</sup> International Congress of International Society of Forensic Haemogenetics, San Francisco.
- Anderson S, Bankier A.T, Barrell B.G, de Bruijn M.H.L., Coulson A.R, Drouin J, Standen R, Young I.G., 1981, Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature; 290: 457-465.
- Angel C, Bernd. B, 2003, Progress in Forensic Genetics 9, 19<sup>th</sup> International ISFG Congress Ministe. Germany. II: 13-24.
- Akane A, Seki S., Shiono H, Nakamura H., Hasegawa M, Kagawa M, Nakagome Y. 1992. Sex determination of forensic samples by dual PCR amplification of an X-Y homologous gene. Forensic Science International. 52: 143-148.
- Bandelt H., Quintana-Murci L., Salas A, Macaulay V. 2002. The fingerprint of phantom mutations in mitochondrial DNA data. Am. J. Hum. Genet. 71:1150-116.
- Butler John, *Forensic DNA Typing*, 2001.
- Corach D, Sala A., Penaccino G. and Sotelo A, 1995, Mass Disasters: Rapid Molecular Screening of Human remains by means of STR typing. Electrophoresis; 16//9): 1617-1623.
- Dpto. de Toxicología y Legislación Sanitaria, Cuaderno de prácticas (4): 123-128  
-Facultad de Medicina-Madrid-

- Falco Federico, *Química Lega*, 1936l.
- Kirby L 1992. DNA Fingerprinting an Introduction.
- Kumar S., Tamura K., Nei M. 1993. MEGA: molecular envolutionary genetics analysis, version 2.1. Pennsylvania State University, University Park.
- Lorente Antonio, *El ADN y la identificación en la investigación criminal y en la paternidad biológica*, 1995, I:13-59.
- Manual de curso de postgrado en estadística aplicada a Genética Forense, Caracas-Venezuela 2002, 12: 54-89.
- Manual fabricante kit Phosphatesmo KM.
- Manual fabricante kit PCR Amplification , kit AmpFI STR Profiler  
Kirk Paul 1953, Crime Investigation.
- Martínez Jarreta Begoña, La prueba del ADN en Medicina Forense, 1999, 3: 222-240.
- Michael A. Peat, 2001, Journal of Forensic Sciences, vol.46, N°1.
- Mullis K.B., Faloona F.A. 1987. Specific síntesis of ADN in Vitro via polymerase catalyzed chain reaction. Meth Enzymol. 155: 335-350.
- Simon J.B. Occult Blood Screening for Colorectal Carcinoma: A Critical Review, Gastroenterology, Vol. 1985; 88:820. (Manual fabricante kit Dia Spot)
- Technical Manual. PowerPlex Y System 2003, Instruction for use of products DC6760 and DC6761.
- Technical Manual. PowerPlex 16 System 2003, Instruction for use of products DC6760 and DC6761.

- Watson, BaKer, bell, gann, Levive, losick, Biología Molecular del gen, 2006, 5ta. Ed. Cap.6: 111-118.